

549,606

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
7. Oktober 2004 (07.10.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/085683 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12Q 1/70**

(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP2004/003044**

(22) Internationales Anmeldedatum:
23. März 2004 (23.03.2004)

(25) Einreichungssprache: **Deutsch**

(26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**

(30) Angaben zur Priorität:
103 13 388.7 25. März 2003 (25.03.2003) **DE**

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **BUCHNER, Erwin** [DE/DE]; Freiherr-vom-Stein-
Strasse 22a, 65205 Wiesbaden (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **HILFRICH, Ralf**
[DE/DE]; Zum Römerberg 24, 65597 Hünfelden (DE).

(74) Anwälte: **PLATE, Jürgen** usw.; Patentanwaltskanzlei
Zounek, Rheingaustrasse 196, 65203 Wiesbaden (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): **AE, AG, AL,**

AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): **ARIPO** (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT,
RO, SE, SI, SK, TR), **OAPI** (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu ver-
öffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: **METHOD FOR EARLY CARCINOMA DETECTION AND A TEST KIT FOR CARRYING OUR SAID METHOD**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR FRÜHDIAGNOSE VON CARCINOMEN UND TESTKIT ZU DESSEN DURCHFÜH-
RUNG**

(57) Abstract: The invention relates to a method for early carcinoma detection and to the precursors thereof provoked by human papilloma virus or associated therewith, a diagnosis being based on corporal samples. The inventive method consists in determining the existence of the viral protein of the human papilloma virus. Said viral protein is embodied in the form of a capsid protein, in particular the major L1 capsid protein. A test kit for carrying out said method is also disclosed.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur frühen Diagnose von Carcinomen und ihren Vorstufen, die durch humane Papillomviren hervorgerufen werden oder eine Assoziation zu humanen Papillomviren aufweisen, anhand von Körperproben. In dem Verfahren wird bestimmt, ob ein virales Proteins der humanen Papillomviren exprimiert wird. Das virale Protein ist ein Capsidprotein, insbesondere das majore Capsidprotein L1. Ausserdem betrifft die Erfindung ein Testkit zur Durchführung des Verfahrens.

WO 2004/085683 A2

Verfahren zur Frühdiagnose von Carcinomen und Testkit zu dessen Durchführung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur frühen Diagnose von Carcinomen oder Vorstufen davon, die durch Humane Papillomviren hervorgerufen werden oder eine Assoziation zu humanen Papillomviren aufweisen. Die Erfindung betrifft ferner ein Testkit zur Durchführung des Verfahrens.

Seit Ende der 60iger Jahre werden in Deutschland Vorsorgeprogramme für verschiedenen Carcinome angeboten. Für das Cervix-Carcinom basieren diese auf der zytomorphologischen Untersuchung von Zellabstrichen der Cervix uteri nach der Methode von G. Papanicolaou, dem sogenannten Pap-Test. Hierbei wird in regelmäßigen Abständen bei Frauen im Rahmen der gynäkologischen Routineuntersuchung Zellmaterial entnommen und auf einen Glasobjektträger aufgebracht und gefärbt. Anhand der Morphologie der Zelle werden die Abstriche klassifiziert und als unauffälliger Abstrich, entzündliche Veränderung, leichte Dysplasie, mäßige Dysplasie, schwere Dysplasie, Carcinoma in situ bzw. Carcinom entsprechend Pap I bis V bezeichnet (s. H.J. Soost, The Munich nomenclature, *Recent Results Cancer Res.* **133** [1993] S. 105-111). Bei einem auffälligen Ergebnis des Pap-Tests wird eine Biopsie entnommen und einer histopathologischen Untersuchung unterzogen, durch welche die Art und Ausprägung der Dysplasie festgestellt und als cervikale intraepitheliale Neoplasie (CIN I bis III) eingestuft wird. Die Anwendung des Pap-Tests über die letzten 30 Jahre hat gezeigt, dass innerhalb eines Kollektivs mit gleich schwerer Entartung die Wahrscheinlichkeit einer Remission zum Gesunden mit zunehmender Schwere der Dysplasie abnimmt.

Bisher sind für einzelne Präparate keine Aussagen zum Remissions- oder Progressionsverhalten möglich.

- 2 -

Papillomviren sind kleine, doppelsträngige DNS-Viren mit einem Genom von ca. 8000 Basenpaaren. Zur Zeit sind mehr als 150 verschiedene humanpathogene Virustypen bekannt. Die Papillomviren lassen sich entsprechend ihrem Epithel-tropismus entweder der mukokutanen Gruppe (Warzenbildung, kutane
5 Neoplasien) oder der anogenitalen Gruppe (Kondylome, Anal- und Zervix-Carcinom) zuordnen.

Die HPV Infektion ist in den meisten Fällen asymptomatisch. Deshalb muss der latente Virusinfekt von der Viruserkrankung mit mikroskopisch („subklinisch“) oder
10 klinisch erkennbarer Gewebeläsion unterschieden werden.

Einige Typen der Papillomviren sind karzinogen, d.h. diese Virustypen (z.B. HPV 16, 18) können entscheidend zur Transformation von Epithelzellen beitragen. Diese Viren werden als High risk Gruppe bezeichnet. Im Gegensatz hierzu stehen
15 die nicht oder nur sehr gering karzinogenen Virustypen (z. B. 6, 11) der Low-risk-Gruppe.

Die HPV Infektion ist die häufigste, sexuell übertragbare Infektion des Menschen. Die Angaben zur Prävalenz differieren erheblich und sind vom zu untersuchenden
20 Ausgangsklientel abhängig. Nach Aufnahme erster Sexualkontakte steigt die Infektionsrate naturgemäß zunächst drastisch an. In Nordamerika und in Teilen Europas beträgt die Durchseuchung mit humanen Papillomaviren in der Altersgruppe der 15- bis 25jährigen Frauen über 50%. Die Rate nachgewiesener Infektionen sinkt kontinuierlich mit zunehmenden Alter. Sie beträgt nach dem 50.
25 Lebensjahr weniger als 5%.

Als Screeningmethode in der Vorsorgeuntersuchung der Frau wird die Entnahme von Cervixzellen mit anschließender Papanicolaou-Färbung durchgeführt. Diese Methode erlaubt die frühzeitige Erkennung morphologischer Zellveränderungen
30 (Krebsvorstufen), die bei der Entstehung des Gebärmutterhals-Carcinoms

- 3 -

auftreten. Diese routinemäßig durchgeführten Untersuchungen haben dazu beigetragen, dass die Inzidenz der Zervix-Carcinome kontinuierlich gesunken ist. Dennoch erkranken in Deutschland aus unterschiedlichen Ursachen jährlich etwa 6000 Frauen an einem Zervix-Carcinom.

5

Humane Papillomviren spielen bei der Entstehung des Zervix-Carcinoms eine entscheidende Rolle. Deshalb zielen unterstützende diagnostische Methoden auf den Nachweis der Virusinfektion ab. Bei der Anwendung molekularbiologischer Methoden wie PCR oder Nukleinsäure-Hybridisierung zum Nachweis der viralen Nukleinsäure werden wegen der extrem hohen Sensitivität eine große Anzahl latenter Infektionen erfasst. Der bei einer HPV-Infektion stets positive DNA-Nachweis ist somit unabhängig vom Verlauf der produktiven Phase und erlaubt daher keine prognostische Aussage. Die Bedeutung der viralen Proteinsynthese für den Verlauf der Infektion und die daraus resultierende prognostische Bedeutung wurde bisher nicht untersucht.

10

15

Es ist bekannt, dass folgende Proteine in Abhängigkeit vom viralen Lebenszyklus gebildet werden: Early Protein (E) 1, E2, E4, E5, E6, E7, late Protein (L)1 und L2 (H.R. McMurray, D. Nguyen, T.F. Westbrook, D. J. McCance, Biology of human papillomaviruses, in *Int. J. Exp. Pathol.* **82** [2001] 15 - 33).

20

Das Capsidprotein L1 wird im Zytoplasma der Wirtszelle synthetisiert und anschließend in den Kern der Zelle transportiert. Dort interagiert das Capsidprotein mit der viralen DNS und bildet reife Viren. Der Nachweis des Capsidproteins L1 erlaubt daher die Aussage, dass das Virus eine produktive Phase durchläuft. Reife, infektiöse Viren werden von der infizierten Zelle abgegeben. Das Verfahren basiert in einer besonderen Ausführungsform auf monoklonalen Antikörpern, die spezifisch das Capsidprotein L1 der Papillomviren erkennen. Geeignete monoklonalen Antikörper sind in der DE 43 32 596 A1 offenbart. Der Screening Test erkennt alle bis heute bekannten Papillomviren und

25

30

- 4 -

eignet sich daher zum Nachweis, ob das Capsidantigen gebildet wird, und die produktive Phase einer HPV-Infektion vorliegt oder nicht. Der High risk Nachweis erkennt selektiv die Risikotypen HPV 16, 18, 33, 35, 39, 45, 51, 56, 58 (siehe z. B. M. Sapp, U. Kraus, C. Volpers, P.J.F. Snijders, J.M.M. Walboomers, J.E. Streeck, Analysis of type-restricted and cross-reactive epitopes on virus-like particles of human papillomavirus type 33 and in infected tissue using monoclonal antibodies to the major capsid protein, in *J. Gen. Virol.* **75** [1994] 3375 - 3383).

Des weiteren stehen L1-spezifische Antikörper für den Nachweis einzelner HPV Typen z.B. HPV 16 zur Verfügung.

Der vorliegenden Erfindung liegt die Beobachtung zugrunde, dass bei HPV-High risk-DNA-positiven, leichten bis mäßigen Dysplasien die Bildung des Capsidantigens L1 der humanen Papillomviren mit einer Rückbildung der Entartung verbunden ist, wohingegen das Fehlen von HPV-Hüllenproteinen mit einem Voranschreiten der Erkrankung korreliert. Die Erfindung erlaubt daher eine relativ sichere Prognose, ob sich eine Entartung entwickeln wird.

Gegenstand der Erfindung ist demgemäß ein Verfahren zur frühen Diagnose von Carcinomen oder Vorstufen davon, die durch humane Papillomviren hervorgerufen werden oder eine Assoziation zu humanen Papillomviren aufweisen, anhand von Körperproben, das dadurch gekennzeichnet ist, dass festgestellt wird, ob ein Capsidprotein eines humanen Papillomvirus (HPV) exprimiert wird.

Der Ausdruck „Carcinome und Vorstufen davon“ umfasst Carcinome jeglicher Art und Herkunft sowie auch Vorstufen davon, die eine Assoziation zu humanen Papillomviren aufweisen. Beispielsweise können es Carcinome des Anogenitaltraktes, insbesondere das Cervixcarcinom sein. Insbesondere auch die Vorstufen, z.B. leichte bis mäßige Dysplasie (cervivale intraepitheliale Neoplasie (CIN I – III) etc. sind besonders zu nennen.

- 5 -

Der Ausdruck „Capsidprotein der humanen Papillomviren“ bezieht sich auf die Capsidproteine aller HPV-Typen, insbesondere auf das (majore) Capsidprotein L1 und das (minore) Capsidprotein L2 der Viren.

5 Der Ausdruck „Körperprobe“ umfasst jede Körperprobe, in der das Capsidprotein nachgewiesen werden kann. Beispiele solcher Körperproben sind Abstriche, Biopsien, Organpunktate, Blut, Sputum, Urin, Stuhl, Liquor, Lymphflüssigkeit etc. Insbesondere sind Abstriche und Biopsien gemeint, wenn es sich um den Nachweis des Cervixcarcinoms handelt.

10

Der Ausdruck „Bestimmung der Capsidbildung“ umfasst alle Verfahren, die sich zum Nachweis der Bildung des Capsidantigens, ihrer mRNA, ihrer Zwischenstufen oder ihrer Vorläufer eignen. Explizit gemeint sind hier auch Transkriptionsfaktoren, die die Bildung des Capsidproteins beeinflussen und/oder steuern, aber
15 auch serologische und/oder immunologische Reaktionen, die auf das Capsidantigen zurückzuführen sind.

Der Nachweis der Expression des Capsidproteins kann auf der Nukleinsäure- und/oder der Proteinebene erfolgen.

20

Für den Nachweis auf Proteinebene können z.B. immunhistochemische oder immuncytochemische Färbeverfahren, aber auch Western blot, ELISA oder Immunpräzipitation verwendet werden. Auch können Antikörper verwendet werden, die gegen das Capsidantigen gerichtet sind. Günstig kann es sein, wenn
25 die Antikörper auf festen Trägern, wie Mikrotiterplatten, Teststreifen oder Latexpartikeln fixiert sind.

Mit dem vorliegenden Verfahren ist es möglich den Krankheitsverlauf eines Carcinoms frühzeitig, d.h. bereits in den Vorstufen zu diagnostizieren.

30

- 6 -

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Testkit zum Nachweis von Carcinomen oder Vorstufen davon, das ein Reagenz umfasst mit dem sich feststellen lässt, ob ein HPV-Capsidprotein exprimiert wurde.

5 Das Capsidprotein fungiert dabei allgemein als Antigen. Als Nachweis-Reagenz enthält das Testkit vorzugsweise ein anti-Maus-Immunglobulin in Kombination mit einem Enzym, vorzugsweise einer Peroxidase. Darüber hinaus umfaßt das Testkit einen Stoff zum Anfärben des Präparats, zweckmäßig eine Chromogenlösung, und kann daneben übliche Bestandteile, wie Puffer, Träger
10 und/oder Marker enthalten.

Mit der vorliegenden Erfindung ist es möglich, Carcinome frühzeitig zu diagnostizieren. Insbesondere können Vorstufen von Carcinomen frühzeitig erkannt und die Krankheitsverläufe ermittelt werden.

15 Kennzeichnend ist auch, dass die durch die erfindungsgemäße Verfahren erzielten Ergebnisse nicht einer subjektiven Bewertung unterliegen. Des weiteren zeichnet sich die vorliegende Erfindung durch schnelle und einfache Handhabung aus, wodurch sie für große Screeningmaßnahmen, insbesondere in Ländern der
20 dritten Welt, geeignet ist. Somit stellt die vorliegende Erfindung einen wichtigen Beitrag zur modernen Krebsdiagnostik HPV-assoziiierter Krebserkrankungen dar.

Die Erfindung wird durch folgendes Beispiel erläutert:

25 Ein Kollektiv aus 86 zytologischen Abstrichen, die alle eine leichte bis mäßige Dysplasie aufwiesen und alle HPV-High risk-DNA-positiv waren, wurde mit L1-spezifischen Antikörpern auf die Bildung des Capsidantigens L1 untersucht. Die Untersuchung erfolgte mit Hilfe des ®Viroactiv-Kits (erhältlich von Virofem Diagnostik und Forschungs GmbH), das Antikörper gegen das Capsidprotein L1
30 umfasst. Die Präparate wurden gekocht und nach Zugabe der Antikörper 30 min

- 7 -

bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die sukzessive Zugabe des Nachweisreagenz (Ziege-anti-Maus-Immunglobulin) und der Chromogenlösung (AEC) färben sich die positiven Zellkerne an.

- 5 Ein Abstrich wurde als positiv gewertet, wenn zumindest eine Zelle des Präparates eine spezifische rote Anfärbung des Zellkerns aufwies.

29 Präparate waren unter diesem Kriterium positiv, dies entspricht 33,7%. Bei den Frauen über 25 Lebensjahren, bei denen das Capsidantigen gebildet wurde, betrug die Remissionshäufigkeit 77,3 %, bei den Frauen über 30 Lebensjahren sogar 82,4%. Die Progressionswahrscheinlichkeit zu histologisch gesicherten schweren Dysplasien oder Carcinoma in situ betrug nur 22,7 bzw. 17,6%.

10

57 Präparate waren negativ für die Bildung des Capsidantigens. Dies entspricht 66,2%. Bei den Frauen über 25 Jahren, bei denen das Capsidantigen nicht nachweisbar war, zeigten nur 25 % eine Remission, jedoch 75 % eine Progression. Bei den Frauen jenseits des 30. Lebensjahres betrug die Remissionshäufigkeit 22,2%. 77,8 % wiesen eine Progression des Befundes auf.

15

20

-.-.-

Patentansprüche

1. Verfahren zur Diagnose von Carcinomen oder Vorstufen davon, die durch humane Papillomviren hervorgerufen werden oder eine Assoziation zu humanen Papillomviren aufweisen, anhand von Körperproben, dadurch gekennzeichnet, dass festgestellt wird, ob ein Capsidprotein eines humanen Papillomvirus (HPV) exprimiert wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Capsidprotein das Capsidprotein L1 oder L2 ist.
3. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Carcinome Anogenital-Carcinome sind.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Anogenital-Carcinom ein Cervix-Carcinom ist.
5. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Körperproben Abstriche oder Biopsieproben sind.
6. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Bestimmung der Expression auf der Nucleinsäure-Ebene erfolgt.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass bestimmt wird, ob eine mRNA, die ein Capsidprotein des humanen Papillomvirus codiert, oder ein anderer, für ein Capsidprotein spezifischer Transkriptionsfaktor vorhanden ist.

- 9 -

8. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass bestimmt wird, ob eine serologische und/oder immunologische Reaktion auf das Capsidantigen vorhanden ist.
- 5 9. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Bestimmung der Expression auf Proteinebene erfolgt.
- 10 10. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Bestimmung der Expression auf der Nucleinsäure-Ebene und auf der Protein-Ebene erfolgt.
- 15 11. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Bestimmung der Expression des Hüllenproteins mit Hilfe von Antikörpern erfolgt, die gegen das Capsidprotein gerichtet sind.
- 20 12. Testkit zum Nachweis von Carcinomen oder Vorstufen davon, die von humanen Papillomviren hervorgerufen werden oder mit humanen Papillomviren (HPV) assoziiert sind, anhand von Körperproben, dadurch gekennzeichnet, dass das Testkit ein Reagenz umfasst mit dem sich feststellen lässt, ob ein HPV-Capsidprotein exprimiert wird.
- 25 13. Testkit nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass das Reagenz monoklonale Antikörper gegen HPV-Capsidproteine, insbesondere gegen das Capsidprotein L1 oder L2, umfasst.
14. Testkit nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Antikörper auf einem festen Träger fixiert sind.

- 10 -

15. Testkit nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß es als Nachweis-Reagenz ein anti-Maus-Immunglobulin in Kombination mit einem Enzym, vorzugsweise einer Peroxidase, umfaßt.
- 5 16. Testkit nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass es zur Durchführung eines ELISA-Tests geeignet ist.

-.-.-